

■ DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES ■ DEL GANADO UTILIZANDO TÉCNICAS MOLECULARES

Lucía Álvarez
alvarez.lucia@inta.gob.ar
Ana Clara Mignaqui
mignaqui.anaclara@inta.gob.ar
Carlos Robles
robles.carlos@inta.gob.ar
Grupo de Salud Animal
Área de Producción Animal
INTA Bariloche

Las técnicas basadas en la detección del ADN de patógenos significan un gran paso en el diagnóstico rápido y preciso de los agentes causales de las enfermedades infecciosas que afectan al ganado

Importancia de una majada saludable y el diagnóstico preciso de las enfermedades

La Patagonia se caracteriza a nivel ganadero por una alta variedad de sistemas productivos, básicamente delineados por las condiciones agroecológicas de cada lugar, la magnitud y el grado de organización del emprendimiento ganadero, las especies que se crían y el objetivo de producción (carne, fibra o leche). Sea cual fuere el sistema de producción ganadero, el objetivo debe estar enfocado a producir en forma rentable. Para ello, entre otros elementos a tener en cuenta, es necesario que la majada o rodeo esté en un buen estado de salud para poder expresar al máximo su potencial productivo.

La salud de los animales es un tema de gran relevancia, y está en relación directa con una adecuada alimentación, un correcto plan de manejo y un buen programa de prevención de las enfermedades más comunes. Sin embargo, para lograr el objetivo es indispensable conocer qué enfermedades están presentes y cuál es su prevalencia. Para ello es imprescindible, no sólo el trabajo

de campo de los veterinarios rurales, sino también contar en los laboratorios con técnicas de diagnóstico que nos indiquen con la mayor precisión posible cuál es la causa de la enfermedad.

En el caso de las enfermedades infecciosas bacterianas es necesario aislar la bacteria que las provoca, lo que tradicionalmente se realiza a través de técnicas de bacteriología que presentan ciertas desventajas y limitaciones que dificultan la obtención de resultados en un tiempo prudencial. A su vez, otro factor fundamental para asegurar un buen resultado es la calidad de las muestras que llegan al laboratorio. Debido a los sistemas extensivos de producción característicos de la Patagonia y a la lejanía de los centros de diagnóstico es difícil que lleguen al laboratorio muestras de buena calidad; en muchos casos se reciben con un grado avanzado de descomposición, imposibilitando el aislamiento del agente causal de la enfermedad.

A fin de mejorar el diagnóstico de las enfermedades del ganado y aprovechando las posibilidades que ofrecen las nuevas tecnologías disponibles, en el Grupo de Salud Animal del INTA

Bariloche se comenzó a trabajar en pruebas diagnósticas basadas en biología molecular.

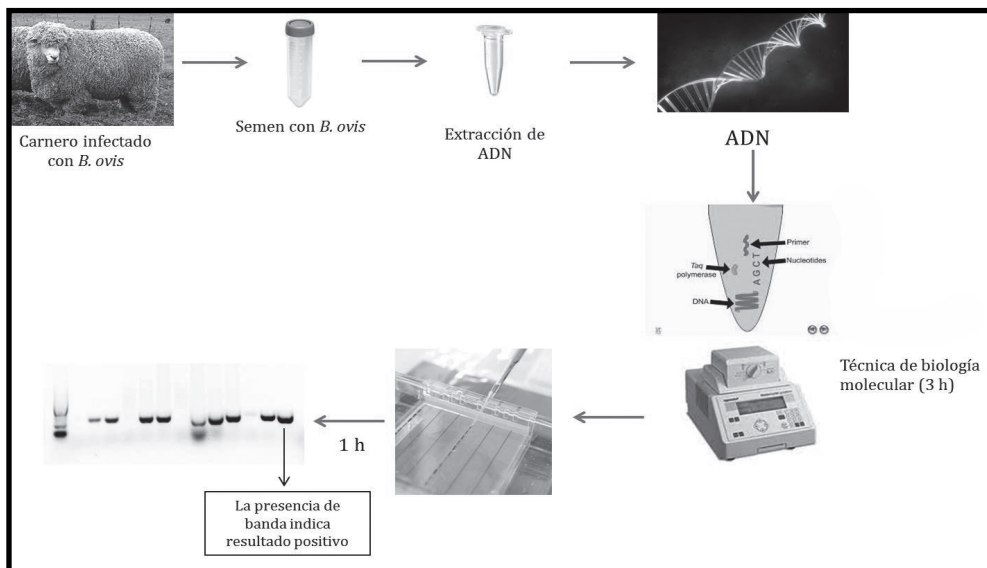
Qué son y cómo funcionan las técnicas basadas en biología molecular

Los métodos diagnósticos basados en biología molecular son sumamente variados y han revolucionado diversos campos de las investigaciones biológicas. En el caso del diagnóstico de enfermedades infecciosas no sólo permiten la detección de los microorganismos sino también su caracterización. Dentro de las técnicas diagnósticas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) es la que mayor difusión ha tenido tanto en salud humana como animal.

A diferencia del cultivo microbiológico donde se trata de obtener la bacteria viva para poder analizarla e identificarla a partir de sus características,

la PCR detecta el ADN del microorganismo independientemente de que la bacteria esté viva o muerta. El ADN es el “material genético” de las bacterias y virus causantes de las enfermedades y tiene la característica de ser único y diferente para cada tipo de organismo.

Cuando las muestras llegan al laboratorio (muestras de semen, sangre, hisopados, órganos o tejidos, etc.) se procesan para extraer el ADN de los patógenos que pudieran estar presentes mediante diferentes métodos. Luego se realiza la amplificación por PCR de un fragmento deseado y conocido de ese ADN, obteniendo resultados en forma rápida y precisa en unas pocas horas (Figura 1). Es decir que las pruebas moleculares sobre muestras biológicas tienen la ventaja de ser más rápidas que el cultivo convencional (días o semanas), permitiendo el reconocimiento temprano del agente patógeno y el tratamiento inmediato.

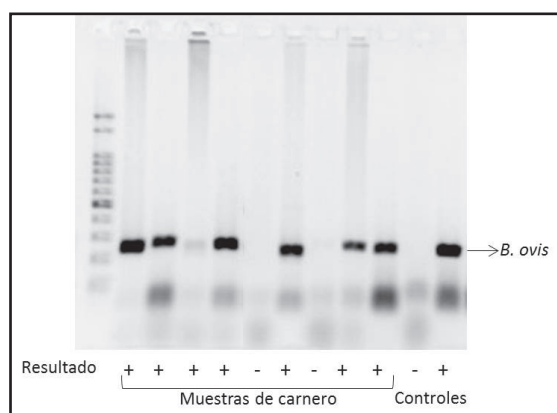


■ Figura 1: Diagnóstico molecular. Técnica de PCR

Experiencia en Brucelosis

La brucelosis ovina, enfermedad que produce infertilidad y descarte de carneros, es causada en la Patagonia por *Brucella ovis* (*B. ovis*). En la Región Patagónica el 66.2% de los establecimientos tienen al menos un carnero infectado y el porcentaje promedio de animales infectados es del 5.8%. Usualmente la enfermedad se diagnostica a través de análisis de sangre y los casos se confirman mediante el cultivo y aislamiento de *B. ovis*. Esta metodología presenta algunas limitaciones. *B. ovis* es una bacteria que demora hasta 10 días en desarrollarse en medios de cultivo y el diagnóstico de certeza por bacteriología puede llevar 20 días o más. Además es común que las muestras lleguen contaminadas y que estos contaminantes se desarrollen en el cultivo enmascarando al verdadero agente causal de la infección.

■ Figura 2: PCR para detectar *B. ovis*. La presencia de banda y su comparación con los controles positivos permite identificar las muestras positivas



Por su parte, la técnica de PCR permite detectar una región del ADN de *B. ovis* que no se encuentra en ninguna otra bacteria. La muestra de elección para esta prueba es el semen del carnero, sobre la que se realiza la extracción del ADN y luego la PCR específica. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que esta PCR diagnóstica es muy precisa, presenta una buena correlación con el cultivo microbiológico y los resultados se obtienen en 2 días (Figura 2).

Actualmente se está trabajando en la validación de una PCR que en un sólo paso permite detectar a *B. ovis*, *Histophilus somni* y *Actinobacillus seminis*, todas bacterias que pueden causar epididimitis y orquitis (inflamación de testículos y perillas) en carneros.

Experiencia en Enterotoxemia

La enterotoxemia es una enfermedad de los ovinos causada por una bacteria llamada *Clostridium perfringens* tipo D que produce una toxina denominada

épsilon, responsable de los síntomas y finalmente la muerte del animal. *C. perfringens* crece en ausencia de oxígeno y se caracteriza por producir una gran variedad de toxinas; cuatro de estas toxinas -alfa, beta, epsilon e iota- se utilizan para clasificar las cepas de *C. perfringens* en cinco tipos bacterianos: A, B, C, D y E (Tabla 1). A su vez, todos los tipos de *C. perfringens* pueden producir otras toxinas accesorias que también generan daño en el animal en determinadas circunstancias como la enterotoxina y la toxina beta 2.

Tabla 1: Clasificación de *C. perfringens* en tipo A, B, C, D y E

Tipo	Toxinas (gen que la codifica)			
	Alfa (cpa)	Beta (cpb)	Epsilon (etx)	Iota (iA)
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

En condiciones normales la bacteria está presente en el intestino de los animales, pero bajo ciertas condiciones -tales como cambios en la dieta, stress, administración de medicamentos por boca, etc.- se multiplica y comienza a producir grandes cantidades de toxinas que desencadenan la enfermedad. Debido a que la bacteria forma parte de la flora intestinal normal de los animales, su mera detección en forma aislada no implica el diagnóstico de la enfermedad. A su vez, no es posible determinar el tipo bacteriano por bacteriología. Por este motivo, para poder diagnosticar las enfermedades causadas por *C. perfringens* es importante no sólo contar con herramientas que permitan aislar la bacteria e identificar el tipo bacteriano, sino también disponer

de información sobre cuáles son los tipos bacterianos prevalentes en el ganado de la región y qué toxinas presentan.

Con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la enterotoxemia se puso a punto una PCR múltiple que permite caracterizar el tipo bacteriano de los aislamientos de *C. perfringens* (Figura 3). Debido a que el contenido intestinal es una de las muestras de elección para el diagnóstico de la enterotoxemia, se está evaluando la aplicación de la PCR directamente sobre el contenido intestinal, de forma de poder identificar el patógeno sin necesidad de aislar a la bacteria primero.

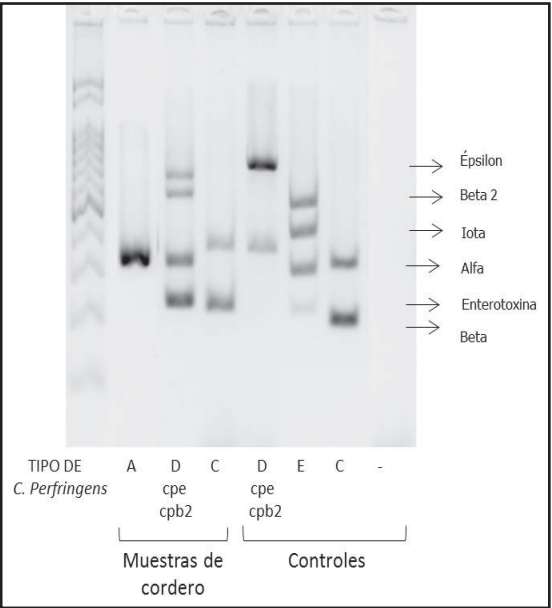


Figura 3: PCR para caracterizar aislamientos de *C. perfringens*. La presencia de bandas y su comparación con los controles positivos permite determinar el tipo de *C. perfringens* y la presencia de toxinas accesorias

Conclusión y futuro

Las técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular han significado un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, teniendo algunas ventajas sobre los métodos tradicionales:

- La PCR permite detectar patógenos cuyo cultivo es difícil, trabajoso y lento para el laboratorio de microbiología de rutina (bacterias intracelulares, virus, etc.).
- En muchos casos la PCR es más sensible que el cultivo microbiológico, es decir que detecta bacterias en muestras que arrojaron resultados negativos al cultivo.
- La PCR permite la caracterización más exhaustiva de los aislamientos bacterianos

ya que por ejemplo permite determinar en un mismo paso si el microorganismo está en la muestra y si presenta alguna toxina importante.

La aplicación de estas técnicas en el Grupo de Salud Animal de INTA EEA Bariloche ha permitido mejorar el diagnóstico de la brucelosis y la enterotoxemia, aumentando la precisión de los diagnósticos como así también disminuyendo el tiempo de obtención del resultado de 20 días a 48 horas.

En el futuro cercano se aspira a poder continuar con la implementación de técnicas moleculares que permitan la identificación de los agentes causales de otras enfermedades tanto bacterianas, como virales y parasitarias que afectan el ganado de la Región Patagónica.

